

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 499 588

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 01863

(54) Enzyme branchante et production d'aliments améliorés.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 N 9/10 // C 12 R 1/11.

(22) Date de dépôt 5 février 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 7 février 1981, n°s 17340/1981 et 17341/1981.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 32 du 13-8-1982.

(71) Déposant : Société dite : KABUSHIKI KAISHA. HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KEN-
KYUJO, résidant au Japon.

(72) Invention de : Shigetaka Okada, Sumio Kitahata, Shigeharu Yoshikawa, Toshiyuki Sugimoto et
Kaname Sugimoto.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Armand Kohn,
5, av. Foch, 92380 Garches.

La présente invention concerne un procédé pour la production d'enzyme branchante, ainsi qu'un procédé pour améliorer, grâce à cette enzyme, la qualité de produits alimentaires.

- 5 Il est bien connu que la rétrogradation des substances amylacées dans les produits alimentaires, conduit inévitablement à une diminution de leur durée de vie en pot, et de leur digestibilité.

- Au cours d'essais empiriques pour supprimer cette rétrogradation, lors du traitement des aliments, on effectue habituellement une hydrolyse partielle de la substance amylacée à l'aide d' α -amylase, et/ou on y ajoute des saccharides. L'utilisation de ces procédés classiques, entraîne des inconvénients pour les propriétés inhérentes des substances
10 amylacées contenues dans ces aliments, comme par exemple l'adhésivité, l'aptitude à donner de la viscosité et à mettre en forme, et elle entraîne une augmentation du pouvoir édulcorant des produits.

- La présente invention permet d'éviter ces inconvénients de l'art antérieur, et d'améliorer la qualité de produits alimentaires contenant des substances amylacées sans nuire à leurs propriétés intéressantes. Elle est basée sur la constatation que l'on réalise ce but par utilisation dans ces produits alimentaires d'un produit de réaction obtenu en soumettant une substance amylacée à l'action d'une enzyme branchante.
20

- Cette enzyme branchante (EC 2.4.1.18), ou Q-enzyme, est une transférase qui agit sur certaines liaisons α -1,4 de glucane linéaire, par exemple l'amylose, de manière à ramifier ce glucane en α -1,6, comme c'est le cas pour l'amylopectine ou le glucogène.
30

- Bien qu'il existe plusieurs publications sur les enzymes branchantes, par exemple par G.S. Drumond et coll., Eur. J. Biochem. Vol. 26, pp. 168-176 (1972), et C. Boyer et coll., Biochemistry, Vol. 16, pp. 3693-3699 (1977), il n'
35

2

y est fait référence qu'à la biosynthèse in vivo et au métabolisme de l'amidon dans la pomme de terre, ou du glycogène dans Escherichia coli.

Le nouveau procédé de production de produits alimentaires améliorés consiste à préparer ou à additionner, ces produits, avec le produit de réaction obtenu en soumettant une substance amylacée à l'action de l'enzyme branchante.

Conformément à l'invention, on peut utiliser comme enzyme branchante, toute enzyme classique provenant de sources variées, comme animal, plante ou microorganisme, dans la mesure où l'utilisation du produit de réaction obtenu par son action sur une substance amylacée, améliore les qualités des produits alimentaires. Convient tout particulièrement, conformément à l'invention, une enzyme branchante découverte par la demanderesse, en provenance de microorganismes du genre bacillus, qui peut être facilement produite à grande échelle et qui est hautement dénuée de risques.

Convient comme substance amylacée sur laquelle on fait agir l'enzyme branchante, toute substance amylacée dont les liaisons α -1,4 sont enzymatiquement converties par l'action de cette enzyme en α -1,6, de manière à former une nouvelle structure ramifiée : conviennent par exemple amylose, amylopectine, amidon ; dextrine, et amylose de bas poids moléculaire obtenu par dégradation de l'amylopectine à l'aide d'enzyme débranchante ; ainsi que des graines et tubercules à teneur élevée en substance amylacée.

En ce qui concerne le procédé grâce auquel le produit de réaction, obtenu par soumission d'une substance amylacée à l'action de l'enzyme branchante, est incorporé dans les produits alimentaires, convient tout procédé dans la mesure où les objectifs de l'invention sont atteints : par exemple, une solution de substance amylacée, préparée par gélatinisation et dispersion, est d'abord soumise à l'

action de l'enzyme branchante, et puis est mélangée sans traitement ultérieur ou, si nécessaire, après concentration et/ou séchage, avec les produits alimentaires. Ou bien, la substance amylacée est d'abord chauffée en présence de l'enzyme branchante afin de réaliser simultanément la gélatinisation et la réaction enzymatique, et le produit résultant est ensuite préparé dans les produits alimentaires comme voulu.

Conformément à l'invention, la rétrogradation de la substance amylacée dans les produits alimentaires est suffisamment annulée en raison du traitement de la substance au moyen de l'enzyme branchante, et le traitement en rend la digestibilité satisfaisante. Ce traitement peut aussi améliorer différentes propriétés des produits alimentaires, par exemple effet croquant, adhésivité, aptitude à communiquer de la viscosité ou à mettre en forme, consistance, dispersibilité et éclat, et est très efficace pour le maintien de leurs propriétés naturelles souhaitables sur une longue période de temps, prolongeant beaucoup leur durée de vie en pot.

L'invention peut s'appliquer à tous les produits alimentaires qui contiennent des substances amylacées : par exemple, produits de confiserie et de boulangerie comme gâteaux secs, biscuits, biscuits de Savoie, gâteaux de riz, produits sucrés de boulangerie et pains ; nouilles et pâtes comme vermicelle au blé noir, vermicelle chinois et macaroni ; et des assaisonnements comme roux au curry, et extraits de compote et potage.

En plus des substances amylacées décrites plus haut, d'autres substances amylacées peuvent être également soumises à l'action de l'enzyme branchante, par exemple poudre ou farine de céréale comme poudre de riz cireux, farine de blé et amidon de maïs, et le produit résultant peut être avantageusement utilisé dans les confiseries et autres produits alimentaires.

Les exemples suivants sont une illustration non limitative de la production d'enzyme branchante et de produits alimentaires obtenus grâce à elle.

EXEMPLE A-1

5 Production d'enzyme branchante de bacillus

La souche de bacillus megaterium 10-5, utilisée dans cet exemple, provient d'un sol de Kita-ku, Osaka, Japon.

Elle a été déposée le 28 Janvier 1981 au Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and

10 Technology, Ministère de l'Industrie et du commerce International, et acceptée sous la nomenclature FERM-P N° 5839. Ce qui suit constitue la taxonomie de cette souche.

I. Morphologie

a) morphologie cellulaire :

15 - Après 24 heures de culture sur agar nutritif incliné, à 28°C, on observe des baguettes de forme régulière, aux extrémités arrondies, de $1,25 - 1,5 \times 4 \mu$. Ces cellules comprennent des globules non colorables par le procédé de coloration métachromatique, mais colorables par le pro-
20 cédé de coloration "fat staining". On observe occasionnellement une forme de courte chaîne ou filiforme plus long, et/ou "shadow-form".

- Après 24 heures de culture sur agar glucosé incliné, à 28°C, on observe des baguettes de forme irrégulière, aux extrémités arrondies, de $1,5-2 \times 2-2,5 \mu$. Les
25 globules intercellulaires sont facilement colorables soit par "fat staining", soit par le procédé de coloration à la fuchsine. Pratiquement toutes les cellules sont légèrement courtes, mais certaines sont filiformes.

30 b) mobilité et flagelle : au bout de 6 heures de culture sur agar nutritive inclinée, à 28°C, les cellules sont très mobiles comme le montre l'électro-microphotographie à grossissement 10 000 de la figure 1.

c) spores :

35 - Lors de la culture sur agar nutritif incliné ou

5

extrait de sol incliné, il y a formation aisée de spores, c'est-à-dire au bout de 1 à 2 jours.

- Sporangies : on note à peine un gonflement de sporange, et la formation de spores se trouve près de l'extré-
5 mité des sporanges.

- Type de spore et dimension : forme ellipsoïdale ou ovale ; 1-1,5 x 1,25-2,5 μ .

d) Réaction de Gram : les cellules ayant poussé en 6 ou 24 heures de culture sur milieu agar nutritif à 28°C,
10 sont toutes gram positives.

e) Acido-résistance : les cellules ayant poussé en 24 heures de culture sur milieu nutritif à 28°C, ne sont pas acido-résistantes.

f) capsule : Après 18 heures de culture sur milieu
15 agar nutritif incliné, à 28°C, la coloration phosphore-acide tungstique et l'observation électromicroscopique ultérieure, confirment l'ombre autour des cellules, ce qui suggère l'encapsulation.

g) granules métachromatiques : négatives après 24 heu-
20 res de culture sur milieu agar nutritif, à 28°C.

h) globules gras : positifs, après 24 heures de culture sur milieu nutritif agar ou milieu nutritif agar glucosé.

II. Propriétés de la culture

25 a) Culture sur milieu nutritif agar incliné (28°C, 5 jours) : La croissance des cellules est très abondante, et forme des colonies d'un diamètre de 4 à 5 mm pendant 5 jours ; ces colonies sont opaques, brillantes, jaune blanchâtre, et entièrement annulaires, avec une surface ré-
30 gulière et élevée. La teneur de la cellule est homogène. Pendant la culture on n'observe pas de formation de pigment.

b) Culture sur milieu nutritif agar incliné (28°C, 5 jours) ; Sur cette pente, la croissance cellulaire est très
35 facile et abondante. Les colonies sont des anneaux légè-

6

rement élevés avec une surface translucide, sébacée, brillante, jaune blanchâtre, régulière, plate et filiforme.

- c) Culture en suspension sur milieu nutritif (28°C, 2 jours) : La croissance cellulaire est très abondante, et le milieu de culture devient très trouble en l'espace d'un jour ; on observe occasionnellement une aggrégation cellulaire sous forme granulaire. Le trouble diminue au second jour de culture, entraînant la formation en grande quantité de sédiment en forme de lame. On n'observe ni
- 10 anneau superficiel, ni formation de pigment et de gaz.

d) Culture par piqûre sur agar (28°C, 5 jours) : On observe la formation de colonies autour des points de piqûre, et dans la couche supérieure d'agar, la croissance cellulaire est filiforme.

- 15 e) Culture par piqûre sur gélatine :
- Après 5 jours de culture à 20°C, le milieu se liquéfie en "saccate".
 - Après 10 jours de culture à 28°C, le milieu de culture se liquéfie, et ne se solidifie guère au refroidissement.
 - Après 5 jours de culture à 28°C sur plaque à stries d'agar et gélatine, on observe une large zone d'hydrolyse.

f) Tournesol et lait :

- 25 - Après 14 jours de culture à 28°C, le tournesol vire du bleu au rouge pourpre ; le pourpre de bromocrésol du bleu au jaune bleu clair ; et l'on n'observe guère de formation d'acide ni de solidification.
- Lors de la culture sur plaque agar-lait, on observe une large zone d'hydrolyse en peu de temps.
- 30

g) Croissance cellulaire sur protéose-peptone agar-acide : La croissance cellulaire est abondante, et les cellules apparaissent jaune blanchâtre, et à leur surface rugueuse .

- 35 h) Croissance cellulaire sur agar nutritif glucosé, in-

cliné : Elle est identique à celle que l'on obtient sur agar nutritif incliné.

i) Croissance cellulaire sur agar-tyrosine incliné :
La croissance cellulaire est abondante et les cellules
5 ont une surface rugueuse.

j) Croissance cellulaire sur agar-citrate, incliné :
La croissance cellulaire est identique à celle que l'on obtient sur agar nutritif incliné. A mesure que les cellules croissent, le milieu de culture devient rose et alcalin.

10 k) Croissance cellulaire sur bouchon de pomme de terre :
La croissance cellulaire est abondante. Les colonies sont jaunes, molles, épaisses et collantes, et sont rugueuses à leur surface. Une petite partie des colonies tombe au fond du tube à essai. La pomme de terre est décomposée et devient
15 grise.

l) Croissance cellulaire sur agar-soja, inclinée :
La croissance est très facile et abondante. Les colonies sont opaques, brillantes, blanc crémeux, à surfaces élevées et filiformes avec rugosité.

20 m) Croissance cellulaire sur agar-glucose-acide aspartique, incliné :
La croissance est identique à celle que l'on obtient sur agar nutritif incliné, et les colonies sont blanches.

n) Croissance cellulaire sur lait-tomate-levure :
25 Le milieu peptonise.

III. Physiologie

- a) Réduction du nitrate en nitrite : positive.
- b) Production anaérobique de nitrates sous forme gazeuse : Les cellules croissent sans formation de gaz.
- 30 c) Production d'acétyl méthyl carbinol : négative.
- d) Réaction V-P : négative.
- e) Production d'indole : négative.
- f) Production d'H₂S : positive.
- g) Hydrolyse de l'amidon : positive.
- 35 h) Utilisation des citrates : positive.

i) Utilisation des sels d'ammonium et des nitrates :
les deux sont utilisés comme source d'azote.

j) Production de pigment : la formation de pigment
jaune est observée dans la culture aussi bien sur milieu
5 agar-lait que sur bouchon de pomme de terre. La croissance
cellulaire sur un milieu générateur de spore, contenant
de l'extrait de sol, donne un pigment gris.

k) Production d'uréase : positive.

l) Production de catalase : positive.

10 m) Conditions optimales de température et pH pour la
croissance cellulaire : Les cellules croissent dans un in-
tervalle de pH de 5,5 à 9,3 : la valeur optimale de crois-
sance est voisine de 7. Les cellules croissent dans un in-
tervalle de température de 10° à 40°C, avec une croissance
15 optimale aux alentours de 30°C. A 45°C et plus, on n'ob-
serve aucune croissance cellulaire.

n) Action de l'oxygène sur la croissance cellulaire :
Les cellules croissent dans des conditions aérobiques.

o) Essai de Hugh-Leifson (O-F essai) : oxydant.

20 p) Formation d'acide et de gaz à partir des sacchari-
des : On opère à 28°C pendant 14 jours. On n'observe pas
de formation d'acide avec sorbitol ou rhamnose, mais cette
formation se produit avec arabinose, xylose, glucose, su-
crose, lactose, mannitol, ou glycérol. Avec aucun des sac-
25 charides ci-dessus on n'observe de formation de gaz.

q) Hydrolyse de la cellulose : négative.

En faisant référence à la taxonomie décrite plus
haut, et à "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology",
7ème et 8ème éditions, la souche peut être identifiée com-
30 me un microorganisme de *Bacillus megaterium*.

IV. Enzymologie de l'enzyme branchante du *Bacillus*

1) Action enzymatique : L'action de l'enzyme branchante
sur l'amylose à degré de polymérisation proche de 500, en-
traîne ^{une légère} augmentation du pouvoir réducteur, mais aussi une
35 diminution progressive de la coloration à l'iode à mesure.

que se déroule la réaction, ce qui a pour résultat une diminution jusqu'à 10% ou moins, dans l'absorption à 660 nm, du résultat sans action enzymatique.

a) Après avoir soumis le produit obtenu en 1), à l'action soit d' α -amylase saccharifiante de *Bacillus*, soit d' α -amylase pancréatique de volaille. On effectue l'analyse chromatographique sur papier du produit résultant, qui confirme la production d'isomaltosyl maltose et de dextrines hautement ramifiées ; cela suggère la production à partir de l'amylose, de produit à liaison α -1,6, dans lequel les unités de glucose sont liées en α -1,4.

b) Après avoir soumis le produit obtenu en 1), à l'action de l'isoamylase, on fait agir sur le produit résultant une α -amylase saccharifiante de *Bacillus*. L'analyse chromatographique sur papier du produit résultant, confirme l'absence d'isomaltosyl maltose, ce qui suggère que les liaisons α -1,6 sont hydrolysées par l'isoamylase.

c) L'action enzymatique de l'isoamylase sur le produit obtenu en 1), conduit à une augmentation progressive de la coloration à l'iode à mesure que se déroule la réaction, ce qui a pour résultat une augmentation de 1,1 à 10 fois dans l'absorption à 660 nm, par rapport au résultat sans cette action enzymatique. Cela suggère l'hydrolyse des liaisons α -1,6 du produit par l'isoamylase et la formation de dextrine linéaire.

d) Après soumission du produit obtenu en 1), à l'action de la β -amylase, le degré de dégradation s'abaisse à environ 50% de l'amylose de départ, ce qui suggère que la limite de dégradation par la β -amylase diminue en raison des liaisons α -1,6 nouvellement formées.

e) Après soumission du produit obtenu en 1), à l'action de l'isoamylase, le degré de polymérisation moyen du produit résultant est voisin de 14, tel que déterminé par le "Procédé classique de groupes terminaux", dans lequel le degré de polymérisation est calculé avec le pouvoir réduc-

teur et le sucre total. Ce degré de polymérisation est plus proche de celui d'un hydrolysate de glycogène obtenu avec de l'isoamylase (environ 12), que de celui d'un hydrolysate d'amylopectine obtenu avec de l'isoamylase (environ 21). La méthylation complète du produit obtenu en 1), l'hydrolyse acide et l'analyse chromatographique gaz-liquide, ultérieure, donne une longueur de ramification moyenne du produit, voisine de 14, exprimé en unités glucose.

10 2) Spécificité du substrat : L'enzyme branchante, à côté de l'amylose, agit sur amylopectine, amidon, et amylose de bas poids moléculaire, à degré de polymérisation moyen de 18.

3) Essai d'activité branchante :

15 Après purification partielle de l'enzyme branchante et élimination de l' α -amylase, on ajoute à 100 μ l de cette solution enzymatique, 100 μ l d'amylose à 0,1% dans du tampon phosphate 0,05 M (pH 7,5), et on met le mélange à incuber à 25°C pendant 10 minutes. On ajoute au mélange réactionnel 3 ml de solution d'iode 1/300 N, constituée par 0,004 M de IK et 0,005 N HCl, puis l'on détermine l'absorption du mélange à une longueur d'onde de 660 nm. L'unité d'activité branchante est définie comme la quantité d'enzyme qui diminue l'absorption à 660 nm de 0,1% par minute, dans
20 les conditions décrites plus haut. Ce procédé d'essai peut être appliqué quand l'enzyme branchante est souillée d' α -amylase, pourvu qu'un inhibiteur d'amylase, n'inhibant pas l'activité de l'enzyme branchante, par exemple celui qui est produit par le genre *Streptomyces* [S. Ueda et coll.,
25 Agr. Bio. Chem. Vol. 37, N°9, pp.2025-2030 (1973)] soit utilisé simultanément.

4) pH optimal et stabilité du pH :

A pH compris entre 4 et 6, on utilise un tampon acétate, un tampon phosphate à pH compris entre 6 et 8, et un tampon glycine-NaOH pour un pH de 8 à 10. La valeur optimale
35

de pH est déterminée par le procédé d'essai ci-dessus, dans lequel la solution d'amylose est ajustée à différents niveaux de pH. La stabilité en fonction du pH est déterminée d'abord par mise à incuber la solution d'enzyme à différents niveaux de pH, à 25°C, pendant 25 heures, puis par
5 essai de l'activité résiduaire après ajustement à pH 7,5. Les résultats sont donnés dans la figure 2, où figurent en abscisse les valeurs de pH et en ordonnée le pourcentage d'activité relative, la ligne continue représente le pH optimal et la ligne tiretée la stabilité du pH. Le pH optimal
10 est voisin de 7,6, et l'enzyme est stable dans un intervalle de pH compris entre 6,5 et 8,5.

5) Température optimale et stabilité thermique :

La température optimale est déterminée selon le procédé d'essai décrit ci-dessus, dans lequel l'incubation est réalisée à différentes températures. La stabilité thermique est déterminée d'abord par mise à incuber la solution d'enzyme à pH 7,5 et à différentes températures pendant 10 minutes, puis par essai de l'activité enzymatique résiduaire à 25°C. Les résultats sont donnés dans la figure 3, où
20 sont portées en abscisse les températures centigrades et en ordonnée le pourcentage d'activité relative, la ligne continue représente la température optimale, et la ligne tiretée délimite la zone de stabilité thermique. La température optimale est proche de 25°C, et l'enzyme est stable
25 jusqu'à une température d'environ 45°C.

6) Inhibition, activation, et stabilisation de l'enzyme branchante : L'activité de l'enzyme branchante est inhibée par la présence de $2,5 \times 10^{-3}$ M d'ion zinc, mercure ou cadmium. La présence de 10^{-5} M d'acide p-mercurobenzoïque
30 inhibe également l'activité de l'enzyme branchante, en agissant de manière spécifique sur le résidu cystéine de protéine enzymatique. On n'a pas trouvé d'activateurs efficaces : la présence d'acide citrique ou d'acide glucose-
35 1 phosphorique, ainsi qu'il est décrit dans de nombreux

rapports, se révèle inefficace. Tous les composés-SH sont efficaces pour stabiliser l'enzyme branchante ; les produits suivants sont actifs de manière décroissante : dithiotréitol, mercapto-2 éthanol, glutathion de forme réduite, cystéine. La présence de 20% de glycérol augmente la stabilité thermique de l'enzyme branchante. De même, la présence de 0,1% d'albumine de sérum de veau augmente légèrement la stabilité thermique, mais on ne constate pas d'effet stabilisant avec le calcium ou le magnésium.

10 7) Purification :

La purification de l'enzyme branchante est semblable à celle des autres enzymes.

8) Poids moléculaire :

Une ultracentrifugation utilisant un gradient de sucrose et la filtration sur gel, donnent un poids moléculaire de $70\ 000 \pm 20\ 000$.

9) Structure cristalline et analyse élémentaire :

Non confirmées.

10) Point isoélectrique :

20 La concentration sur l'enzyme branchante de l'électrophorèse, donne un point isoélectrique voisin de 4,5.

11) Electrophorèse sur pastille :

L'électrophorèse de l'enzyme branchante purifiée, obtenue au V de l'exemple A-1, à 4°C et 2,5 mA par gel pendant 2 heures, avec du gel de polyacrylamide à 7,5% (pH 9,4), donne un seul pic d'activité de l'enzyme, dans lequel la mobilité contre le bleu de bromophénol est voisine de 0,19.

V. Production de l'enzyme branchante de Bacillus

La souche de *Bacillus megaterium* 10-5 FERM-P N° 5859 est
30 ensemencée dans 15 litres d'un milieu (pH 7) constitué par 2% en poids/volume de sucrose, 1% en poids/volume de peptone, 0,5% en poids/volume d'extrait de viande, 0,1% en poids/volume de phosphate dipotassique, 0,1% en poids/volume de chlorure de sodium, 0,03% en poids/volume de sulfate
35 de magnésium, 0,5% en poids/volume de carbonate de calcium

- (stérilisé séparément) et de l'eau, et l'on cultive à 28°C pendant 45 heures sous agitation et dans des conditions aérobiques. Le bouillon de culture est centrifugé à 3 000 x g, et les cellules récupérées sont détruites à l'aide d'
- 5 un appareil à ultrasons, et le produit résultant est soumis à une centrifugation de 10 000 x g, ce qui donne environ 1,7 litres de liquide surnageant contenant l'enzyme branchante (solution brute d'enzyme). Ce liquide surnageant contient environ 9,6 unités d'enzyme branchante par ml.
- 10 La purification de l'enzyme branchante ainsi obtenue s'effectue comme suit : on ajoute du sulfate d'ammonium au liquide surnageant, et la fraction obtenue pour un degré de saturation de 0,3 à 0,65, est recueillie. Cette fraction est ensuite dissoute dans 10 mM de tampon Tris-HCl (pH
- 15 7,5), contenant 5 mM de mercapto-2 éthanol, et l'on dialyse cette solution contre une préparation fraîche du même tampon. L'enzyme dialysée est alors appliquée sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Suède) pour adsorber l'enzyme, puis on élue celle-ci avec
- 20 une préparation fraîche du même tampon, contenant en plus du chlorure de sodium. La fraction à activité enzymatique est recueillie, et dialysée contre une préparation fraîche du même tampon sans chlorure de sodium. L'enzyme dialysée est fractionnée par chromatographie utilisant 4-Aminobutyl
- 25 Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Suède), ce qui donne une enzyme branchante purifiée d'activité spécifique environ 2 000 fois supérieure à l'activité avant purification, avec un rendement de l'ordre de 30% rapporté à l'enzyme brute de départ.
- 30 La diminution de coloration à l'iode d'un amylose de degré de polymérisation égal à 100, soumis à l'action de l'enzyme branchante purifiée, est représentée à la figure 4, dans laquelle est portée en abscisse la durée de réaction en
- heure, et en ordonnée le pourcentage d'absorption relative
- 35 du mélange réactionnel. Est également indiqué sur cette

même figure, l'augmentation de coloration à l'iode du produit résultant, lorsqu'on le soumet à l'action de l'isoamylase, la ligne continue représente l'action de l'enzyme branchante sur l'amylose, et la ligne tiretée, celle de l'iso-amylase sur le produit résultant.

Il ressort de cette figure 4, que l'absorption à 660 nm diminue à environ 10% ou moins de sa valeur en l'absence d'enzyme branchante. L'action de l'isoamylase sur le produit conduit à une augmentation de 1,1 à 10 fois de l'absorption à 660 nm, par rapport à celle du produit non soumis à l'isoamylase.

EXEMPLE A-2

Enzyme branchante d'*Escherichia coli*

On ensemence *Escherichia coli* IFO 3366 dans 1m3 de milieu à pH 7, constitué par 0,85% en poids/volume de KH_2PO_4 , 1,1% en poids/volume de K_2HPO_4 , 0,6% en poids/volume d'extrait de levure, 0,4% en poids/volume d'acétate de sodium, 0,1% en poids/volume de glucose et de l'eau, et on cultive à 37°C pendant 16 heures. Lorsque la culture est achevée, le bouillon de culture est centrifugé afin de recueillir les cellules, qui sont ensuite détruites en présence de tampon glycyl glycine (pH 7,5) contenant 5 mM de dithio-tréitol, avec un homogénéiseur. Après centrifugation, la partie surnageante est fractionnée avec du sulfate d'ammonium, et la fraction obtenue dans l'intervalle de saturation de 30 à 60%, est recueillie. Cette fraction est alors dialysée contre 50 mM de tampon Tris-HCl (pH 7,5) contenant 5 mM de dithiotréitol.

L'enzyme dialysée est ensuite appliquée sur une colonne de DEAE-cellulose, qui adsorbe l'enzyme, que l'on élue ensuite avec un gradient NaCl (0-0,6N). La fraction à activité enzymatique est récoltée et soumise à filtration sur membrane, ce qui donne une solution concentrée d'enzyme branchante avec un rendement de 11 000 unités environ.

EXEMPLE A-3Enzyme branchante de pomme de terre

10 kg de pomme de terre coupées en tranches, sont plongées dans une solution aqueuse contenant 0,5% en poids/volume de dithionite de sodium et 0,5% en poids/volume de citrate de sodium, pendant 30 minutes. Les tranches de pommes de terre sont ensuite broyées dans un homogénéiseur, et le produit résultant est centrifugé. On ajoute à la partie surnageante une petite quantité d'une solution aqueuse d'acétate de plomb pour former un précipité qui est éliminé par centrifugation. La partie surnageante est alors soumise, comme dans l'exemple A-2 successivement à un relargage, une dialyse, un fractionnement chromatographique au moyen de DEAE-cellulose et une concentration à l'aide d'une membrane filtrante, ce qui donne une solution d'enzyme branchante avec un rendement voisin de 900 unités.

Les exemples suivants concernent la production de produits alimentaires.

EXEMPLE B-120 "UIRO"

A 460 g de "SHIRATAMOKO", une farine de riz, on ajoute 5 000 unités d'enzyme branchante purifiée, obtenue comme dans l'exemple A-1 V, dans 220 ml d'eau, et l'on pétrit suffisamment ce mélange, puis, on y ajoute 930 g de sucre et 280 g de "JOSHINKO", une farine de riz et l'on repétrit.

Le produit résultant est alors couvert d'un linge de coton humide, et cuit à l'étuvée pendant 30 minutes selon un procédé classique. Le produit résultant est refroidi, coupé et façonné pour donner "UIRO", un type de confiserie à base de pâte de riz de style japonais. Ce produit est un "UIRO" semi-transparent, très croquant et à goût excellent, qui garde sa qualité pendant longtemps en raison du fait qu'il n'est que faiblement susceptible de rétrograder.

EXEMPLE B-2Pain

A 680 g de farine de froment on mélange 4 000 unités d'une enzyme branchante, obtenue comme dans l'exemple A-1 V et
5 l'on y ajoute 20 g de sucre et 11 g de NaCl dans une petite quantité d'eau. Après un pétrissage suffisant on additionne ce mélange de 13 g de levure comprimée, 13 g d'huile, 2 g de levure alimentaire et une quantité minimale d'eau, et l'on pétrit afin d'obtenir la pâte pour le pro-
10 duit voulu.

Suivant un procédé classique, on laisse fermenter cette pâte à 26°C pendant 2 heures, on laisse vieillir pendant 15 minutes, et après 15 minutes de durée d'exposition on le fait cuire dans un four à 200°C environ pendant 40 mi-
15 nutes.

Le produit obtenu est un pain de goût excellent et de texture appropriée, qui conserve ses qualités pendant longtemps.

EXEMPLE B-320 "KAMABOKO"

On mélange 4 kg de "Alaska pollack meat" dégelée, hâchée avec 2 000 unités d'une enzyme branchante obtenue comme dans l'exemple A-1 V, 20 g de pullulane dans 400 ml d'eau glacée, 200 g d'amidon de pomme de terre, 80 g de sucre,
25 80 g de glutamate de sodium, 12 g de tripolyphosphate de sodium et 120 g de NaCl, et l'on pétrit suffisamment. Le produit résultant est façonné par un procédé classique, et cuit à l'étuvée pendant environ 30 minutes à une température du produit proche de 80°C.

30 Après refroidissement à température ambiante, on laisse reposer à 4°C pendant 24 heures, pour obtenir le produit intitulé "KAMABOKO" produit typiquement japonais à base de chair de poisson.

Ce kamaboko présente une texture fine, un éclat et un cro-
35 quant excellents.

EXEMPLE B-4"Convenient" Potage

- 1 kg de farine de "weak" est pétri suffisamment dans 360 ml de solution aqueuse contenant 30 g de NaCl et 8 000
- 5 unités d'une enzyme branchante, obtenue comme dans l'exemple A-1 V, et ce mélange est façonné en chapelets. Ces chapelets sont cuits à l'étuvée pendant 2 minutes environ, et chauffés dans une huile à 140°-145°C pour réaliser une déshydratation, suivie d'une pulvérisation. La poudre résultante
- 10 est mélangée de façon homogène avec 100 g de NaCl, 350 g de glutamate de sodium, 5 g d'inosinate de sodium, 200 g de lait en poudre et 10 g d'épice, ce qui donne le potage en question. L'addition de 130 ml d'eau chaude à 20 g de ce produit, dans un récipient, entraîne la dissolution facilement, et donne instantanément un très délicieux potage de consistance appropriée.
- 15

EXEMPLE B-5"MUSHIYOKAN"

- On mélange avec 600 g de farine, 250 g de "KATAKURIKO",
- 20 une farine d'amidon de racine provenant d'Erythronium Japonicum, 20 g de NaCl, 400 g de "SARASHIAN", une pâte obtenue à partir de fèves, 1 kg de sucrose, 1,4 kg de maltose et 2,4 litres d'une solution aqueuse contenant 6 000 unités d'une enzyme branchante obtenue comme dans l'exemple A-2, et l'on pétrit suffisamment. Le produit résultant
- 25 est façonné et cuit à l'étuvée pendant environ 40 minutes, selon un procédé classique, ce qui donne "MUSHIYOKAN", une confiserie typiquement japonaise.
- Le produit est excellent au point de vue goût et propriété
- 30 de croquant, et conserve sa qualité supérieure pendant longtemps en raison de sa faible propension à la rétrogradation.

EXEMPLE B-6Crème renversée

- 35 400 g d'amidon de maïs sont mélangés avec 800 unités d'une

enzyme branchante obtenue comme dans l'exemple A-3 dans 20 ml de solution aqueuse, 1,5 kg de maltose, 1,5 kg de sucrose et 10 g de NaCl, puis on ajoute peu-à-peu à ce mélange 7 kg de lait bouillant, sous agitation et à feu doux.

- 5 On poursuit le chauffage jusqu'à ce que l'amidon de maïs se gélifie et que le contenu devienne semi-transparent. Le contenu refroidi est ensuite mélangé avec une petite quantité de parfum à la vanille.

- Le produit ainsi obtenu est une crème renversée de consis-
10 tance appropriée, dotée d'un éclat excellent et dont la qualité ne change guère après une longue période.

Revendications

1. Procédé pour la production d'enzyme branchante par culture de microorganismes capable de produire cette enzyme, dans un milieu nutritif, suivie de la récolte de ladite enzyme à partir de ce milieu, caractérisé en ce que le micro-
5 organisme appartient au genre Bacillus .
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme est Bacillus megaterium 10-5 FERM-P N° 5859.
3. Procédé pour améliorer la qualité de produits ali-
10 mentaires contenant des substances amylacées, caractérisé en ce que la substance amylacée contenue dans, ou ajoutée à la substance alimentaire, est soumise à l'action d'une enzyme branchante selon une des revendications 1 ou 2.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en
15 ce que le produit alimentaire est une confiserie.
5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le produit alimentaire est un produit de boulangerie.
6. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le produit alimentaire est constitué par des nouil-
20 les.
7. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les produits alimentaires sont des "convenient" aliments.

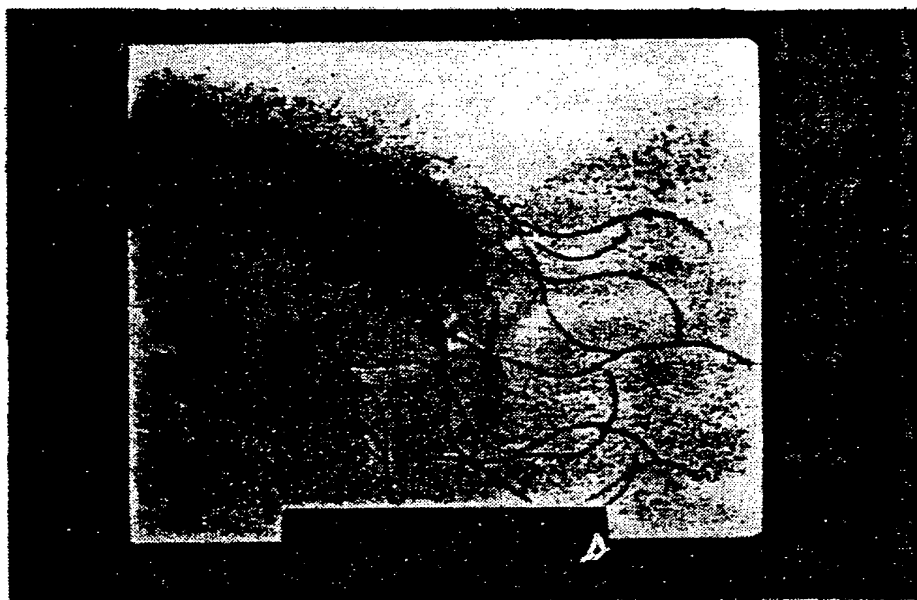
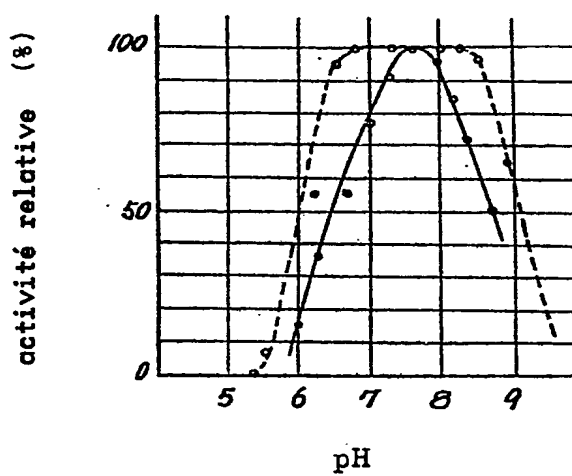
$Fig^{1/2} 1$  $Fig 2$ 

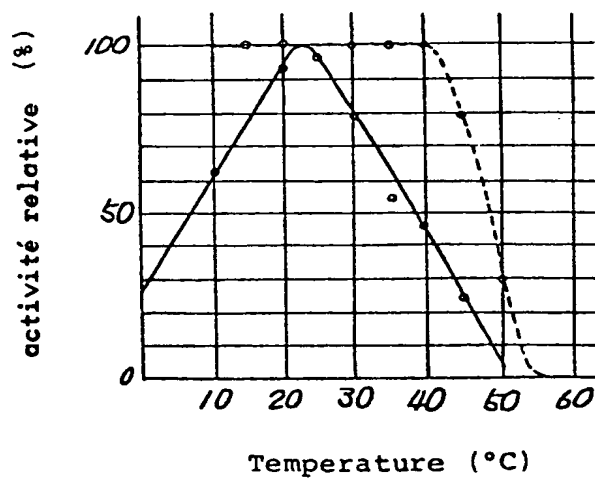
Fig 3^{2/2}

Fig 4

